



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO DE BATATA NA  
EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASES NO TRATO  
INTESTINAL DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Maria Risoleta Freire Marques

**MIRIAM CRISTINA GUALDEZI**

FLORIANÓPOLIS  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gualdezi, Miriam Cristina

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO DE BATATA NA EXPRESSÃO  
E DISTRIBUIÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASES NO TRATO INTESTINAL DO  
CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* / Miriam Cristina  
Gualdezi ; orientador, Maria Risoleta Freire Marques -  
Florianópolis, SC, 2014.

59 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. amilase. 3. camarão marinho. 4.  
amido de batata. 5. nutrição. I. Marques, Maria Risoleta  
Freire . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Efeito da concentração de amido de batata na expressão e distribuição de  $\alpha$ -amilases no trato digestivo do camarão branco**  
*Litopenaeus vannamei*

Por

MIRIAM CRISTINA GUALDEZI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dra. Maria Risoleta Freire Marques – *Orientadora*

---

Dr. Carlos Peres Silva

---

Dra. Débora Machado Fracalossi

---

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño



Dedico a meus pais e em especial a João Gualdezi *in memoriam!*



## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos que me foram dadas.

A meus pais, que mesmo longe, me deram todo o amor e apoio necessários para que eu pudesse estudar e realizar meus sonhos.

A minha orientadora, Maria Risoleta Freire Marques, pela oportunidade, ensinamentos, auxílio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Aos professores que fizeram parte da minha banca, Prof<sup>a</sup> Débora Fracalossi, Prof<sup>o</sup> José Mouriño, Prof<sup>o</sup> Carlos Peres e Prof<sup>a</sup> Isabel C. Muller, que com suas sugestões engrandeceram e valorizaram o trabalho desenvolvido.

A meu amor, Celiano Lavratti, que mesmo chegando no meio da caminhada, foi desde sempre a mão que me afaga, o abraço que me acolhe e o amor que preenche meu coração e me acalma.

Ao grupo Labcai, que me recebeu de portas abertas e me fizeram sentir sempre muito à vontade, enfim, em minha segunda casa.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos, Gabriel, Bruninho, Carlos e o Prof<sup>o</sup> Zé Luiz pela disposição, enfim uma eterna parceria.

Ao Laboratório de Nutrição, família Labnutri, Bruna, Renata, Janice, Lucas e meus amigos Lapadianos, Mauricio, Tulio, Jhon pelo auxílio nas dúvidas, amizade, cumplicidade e dedicação em todos os momentos em que precisei.

Ao Laboratório de Bioquímica de Insetos, minha primeira introdução à bioquímica, Daniela, Ricardo, Gabriel pela paciência, ensinamentos e dedicação prestados.

A minha amiga Ana Carolina Volpato Zanandrea pelo carinho, cuidado em todos os momentos, sua ajuda e companheirismo foram muito importantes nas minhas conquistas.

A minha amiga Aninha pela amizade, companheirismo, ensinamentos, você é um exemplo, da qual eu me espelho não só como profissional, mas também como pessoa.

A minha turminha das "super" meninas Labcai, Claudia, Ceci, Daína, Gabriele, Juliana, Karla, Maya, Naissa, Rafaela, Romi pelos momentos de descontração, pelas risadas e auxílio em todas as dúvidas que surgiram no meio do caminho.

As minhas “miguchas”, Talita, Laurinha e Elisa pela amizade incondicional, pelo apoio, carinho, atenção, força e muitos momentos de alegria, amizade. Sabemos, irá durar para sempre.

A meus colegas de trabalho Miguel, Jacó, Clei, Fabricio, Micael pela ajuda nos momentos de dúvida.

Enfim, a todos que fizeram e fazem parte deste sonho conquistado e auxiliaram de alguma forma para concretização desta etapa da minha vida.

*O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.*

*Cora Coralina*



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da concentração do amido de batata (*Solanum tuberosum L.*) sobre a atividade de  $\alpha$ -amilases nos segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) e hepatopâncreas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. Camarões ( $12 \pm 0,5g$ ;  $n=6$ ) foram submetidos a quatro tratamentos distintos, tendo sido alimentados com ração comercial (controle; CTRL) contendo 32% de proteína bruta e com dietas suplementadas com níveis crescentes de amido de batatas: 20%, 30% e 35%. A análise da atividade amilásica foi realizada pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a uma absorvância de 550 nm. A digestão do amido foi ainda avaliada através de zimograma em gel de poliacrilamida a 10% (PAGE-SDS) a 10%, copolimerizado com amido 2% e corado com Lugol. O perfil transcricional do gene da  $\alpha$ -amilase foi também avaliado nos mesmos tecidos, através de PCR em tempo real (*qPCR*). A atividade da amilase no HPT do camarão *L.vannamei* apresentou um aumento ( $p<0,05$ ) no grupo submetido à dieta contendo 20% de amido. Nos zimogramas referentes à atividade da amilase no HPT, ANT, MED e POST, foi possível observar a presença predominante de bandas com massa molecular aparente entre 66 e 53 kDa e entre 45 e 30 kDa, Os ensaios de *qPCR* indicaram a indução da transcrição do gene da  $\alpha$ -amilase no HPT, em função dos níveis de amido na dieta. Os níveis transcricionais deste gene no HPT parecem ter correlação com os níveis da atividade relativa da amilase neste tecido. A avaliação adicional dos parâmetros bioquímicos e moleculares após diferentes períodos (mais curto e mais longo) de alimentação com a dieta suplementada com amido permitirá melhor compreender a aparente indução da transcrição do gene da amilase no HPT, bem como o perfil da atividade enzimática neste tecido e nos segmentos do intestino, de forma a associá-los com parâmetros zootécnicos e estratégias de cultivo.

Palavras-chave: amilase, digestão, amido, nutrição



## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate and characterize the digestion of potato starch in different segments of shrimp intestine, as well as in hepatopancreas (HPT) in *L. vannamei*. Shrimp ( $12\pm 0,5\text{g}$ ;  $n=6$ ) were submitted to four distinct treatments. One group received commercial fed (control; CTRL), with a 32% content of crude protein, while the other groups were fed with diets supplemented with increasing amounts of potato starch: 20%, 30% and 35%. Amylase activity was measured by the method of 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) under an absorbance of 550 nm, whereas total protein was determined by the Lowry method. Furthermore, starch digestion was assessed by zymograms on 10% polyacrylamide gels (SDS-PAGE), copolymerized with 2% starch and stained with Lugol. The transcriptional levels of the gene encoding  $\alpha$ -amylase were assessed by real-time PCR (*qPCR*). Amylase activity in HPT showed an increase ( $p<0.05$ ) in *L. vannamei* subjected to the diet supplemented with 20 % starch. The zymograms displayed the presence of bands with apparent molecular weight in the range of 66-53 kDa and 45-30 kDa. *qPCR* assays indicated that the  $\alpha$ -amilase gene was induced in HPT in a manner related to the starch levels in the diet. Apparently, the transcriptional levels of this gene in HPT could be correlated to the levels of amylase activity in this tissue. Nevertheless, the additional analysis of the biochemical and molecular parameters after feeding with starch supplemented diet for different periods (shorter and longer) will allow to better understand the apparent induction of the amylase gene in HPT, as well as the profile of amylase in this tissue and in the intestine segments, in order to associate them with parameters and strategies of shrimp production.

Keywords: amylase, digestion, starch, nutrition



## LISTAS FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura amilose (A) formada por ligações do tipo  $\alpha$ 1-4 entre as moléculas de glicose; estrutura amilopectina (B) formada por ligações do tipo  $\alpha$ 1-4 e  $\alpha$ 1-6 entre as moléculas de glicose ..... 24
- Figura 2 - Estrutura do sistema digestório de camarões; M (boca), Oes (esôfago), Prov (proventrículo), AD (intestino anterior), DG (glândula digestiva), MG (intestino médio), PD (Intestino Posterior), R (reto), A (ânus). ..... 25
- Figura 3 - Demonstração do sistema digestório o qual é dividido em duas partes: ST (Intestino), hepatopâncreas (HP). O intestino é dividido em intestino anterior (foregut), médio (midgut) e o intestino posterior (hindgut)..... 34
- Figura 4 - Atividade relativa de  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas nos segmentos do intestino anterior, médio e posterior de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas com amido (20, 30 e 35% de amido de batata na ração) e CTRL (grupo controle).. ..... 38
- Figura 5 - Perfil da atividade de  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas (HPT) e segmentos do intestino, anterior (ANT), médio (MED) e posterior (POST) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas (20, 30 e 35% de amido de batata na dieta) e CTRL (grupo controle)..... 40
- Figura 6 - Géis de poliacrilamida SDS-PAGE (10%) tipo zimograma copolimerizado com amido (2%), corado com Lugol. Demonstrando o perfil de atividade da amilase no *Litopenaeus vannamei* submetido a dietas suplementadas com amido de batata, onde CTRL representa tratamento referente à dieta Controle, 20% (dieta com 20% de amido), 30% (dieta com 30% amido) e 35% (dieta com 35%), no hepatopâncreas (H), intestino anterior (ANT), intestino médio (MED) e intestino posterior (POST) ..... 41
- Figura 7 - Transcrição relativa do gene da  $\alpha$ -amilase nos segmentos do intestino Anterior, Médio e Hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas com amido (20, 30 e 35% de amido de batata na ração) e CTRL (grupo controle) ..... 43



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Análise centesimal das rações suplementadas com amido.....	33
TABELA 2. Iniciadores para a <i>q</i> -PCR utilizados neste estudo.....	37



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
1.1 Uso de carboidrato em dietas para camarões.....	22
1.2 Amido de batata ( <i>Solanum tuberosum L.</i> ).....	23
1.3 Fisiologia do trato digestivo dos camarões.....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO – CARACTERIZAÇÃO DA DIGESTÃO DO AMIDO E TRANSCRIÇÃO GÊNICA NO CAMARÃO BRANCO <i>Litopenaeus vannamei</i></b> .....	28
RESUMO .....	28
ABSTRACT .....	30
<b>5 INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
6.1 Elaboração das dietas experimentais.....	33
6.2 Obtenção da Fonte Enzimática .....	34
6.3 Ensaio atividade da $\alpha$ -amilase.....	35
6.4 Eletroforese em Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% tipo Zimograma com copolimerização de 2% amido.....	34
6.5 Transcrição gênica da amilase em <i>q</i> PCR.....	35
6.5.1 Desenho dos iniciadores para amilase.....	35
6.5.2 Extração de RNA total .....	36
6.5.3 Síntese de cDNA .....	36
6.5.4 Padronização das condições de PCR em tempo real .....	36
6.5.5 Análise estatística.....	37
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
<b>10 AGRADECIMENTOS</b> .....	48
<b>11 REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>10 REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	54



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A carcinicultura é um dos setores mais importantes e que mais cresce na aquicultura em várias partes do mundo, sendo uma das atividades agropecuárias com maior geração de renda. Visando a produção de camarão marinho a nível mundial, a produção de cultivo apresentou um grande aumento nas últimas três décadas, superando a pesca extrativa em 278.539 toneladas (FAO, 2012).

Nas Américas, a produção de camarões peneídeos representou 14,08% da produção mundial, e baseia-se quase inteiramente na produção do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (LIGHTNER, 2011). Em 2010, o *L. vannamei*, representou 71,8% da produção mundial de todas as espécies de camarão marinho cultivadas (FAO, 2012).

No Brasil a carcinicultura apresentou em 2011 uma produção de 69.571 toneladas, sendo que 99% da produção nacional permanecem nos estados do Nordeste, entre Bahia e o Maranhão (ABCC, 2013). Destaca-se a participação do camarão *L. vannamei*, representando quase que inteiramente produção de crustáceos no setor.

Já em Santa Catarina, a produção estadual de camarões em 2012 foi de 272 toneladas mantendo os mesmo valores de produção de 2011. (EPAGRI, 2013).

Contudo, com o aumento na produção e a necessidade de se investir em tecnologias de produção e sistemas de cultivos a fim de suprir a demanda promoveram a busca ainda maior por dietas balanceadas nutricionalmente e com preços mais acessíveis, sendo a ração uma das maiores preocupações na criação de camarão (MARTINEZ-CORDOVA; CAMPAÑA TORRES; PORCHAS-CORNEJO, 2003).

Os mesmos autores descrevem que no cultivo de camarões peneídeos o custo da alimentação pode representar até 50% da produção e, na composição de dietas para crustáceos, a proteína é o ingrediente mais caro e o principal fator limitante para o crescimento. Desta forma, a utilização de fontes proteicas alternativas, tais como rejeitos do processamento de aves e peixes e ingredientes de origem vegetal, têm sido utilizadas (HERTRAMPF, 2007; NIETO-LÓPEZ *et al.*, 2011).

Dentre as fontes de energias não proteicas, os carboidratos são os principais constituintes dos vegetais, compondo até 85% dos grãos, e representando a principal fonte energética presente na formulação de

dietas utilizadas na nutrição animal (MELO *et al.*, 1998). Contudo a eficiência de assimilação de carboidratos depende da qualidade e quantidade do carboidrato inserido na dieta, assim como os mecanismos de regulação de atividade enzimática (ROSAS *et al.*, 2002). Neste contexto, o amido constitui o mais abundante carboidrato de reserva das plantas superiores, podendo estar presentes em sementes, raízes e fibras de plantas (SASAKI, T.; YASUI, T.; MATUKI, J., 2000). O amido constitui o carboidrato mais presente em ingredientes vegetais e para camarões selvagens as plantas representam a fonte mais comum de carboidrato (COUSIN, 1996; ROSAS, *et al.* 2002).

Por outro lado, algumas espécies de peneídeos podem apresentar uma utilização limitada de glicose, Shiau (1998) demonstrou que tal fator pode ser desencadeado como uma possível saturação devido a uma baixa taxa de absorção no trato digestivo. Assim, muitos pesquisadores sugerem a utilização de carboidratos mais complexos em dietas para camarão, tais como amido, que é submetido à hidrólise enzimática antes da assimilação.

Contudo, mesmo o carboidrato da dieta sendo a fonte mais econômica de energia na alimentação, pouca informação sobre a sua utilização pelo camarão está disponível (SHIAU, 1998, ROSAS *et al.*, 2000).

Diante disto, o estudo sobre a digestão de fontes alternativas de energia, como o amido, pode contribuir para a diminuição de custos de produção.

### 1.1. Uso de carboidrato em dietas para camarões

Os carboidratos desempenham uma função importante em vários processos metabólicos, incluindo o ciclo de Krebs, a gluconeogênese, formação de esteroides e ácidos graxos (WIGGLESWORTH; GRIFFITH, 1994).

No ambiente natural, os animais aquáticos, como peixes e camarões, têm acesso limitado a fontes de carboidratos, sendo pouco adaptados e apresentando dificuldades digestivas e metabólicas com a inclusão de altos níveis de carboidratos na dieta (SHIAU *et al.*, 1991).

Uma das primeiras restrições para a utilização de carboidratos na aquicultura é a sua baixa digestibilidade (PERES *et al.*, 1999). Niu *et al.* (2012) observaram que algumas fontes de carboidratos podem influenciar o crescimento e a atividade enzimática de camarões da espécie *Penaeus monodon*.

Simon e Jeffs (2013) ressaltam a necessidade de se estudar potenciais de hipoglicemia devido ao uso de carboidratos em dietas para crustáceos uma vez que, em espécies de vertebrados como os peixes a fome e a regulação da saciedade em curto prazo são mediadas pela utilização da glicose celular, sendo que, em várias espécies de camarões, tal saciedade e diminuição de consumo da dieta foram correlacionadas a níveis maiores de inclusão de amido na dieta (GUO *et al.*, 2006).

Entretanto, mesmo sendo proposto que a primeira fonte de energia para os crustáceos é a proteína Cuzon *et al.*(1980) e Sánchez-Paz *et al.* (2007) evidenciaram em trabalhos que o glicogênio foi utilizado como primeira fonte de energia após privação de alimento a curto prazo para *Penaeus japonicus* e *Litopenaeus vannamei*, respectivamente.

Contudo, os carboidratos são uma das fontes de energia mais baratas para as dietas sendo também um bom aglutinante durante o processo de pelotização (ARNESEN; KROGDAHL, 1993). A sua utilização depende da sua natureza bem como, os tratamentos empregados na elaboração das rações (BERGOT, 1979; SPANNHOF; PLANTIKOW, 1983).

O amido constitui o carboidrato mais presente em ingredientes vegetais (STONE *et al.* 2003), representam também um dos principais nutrientes da ração sendo usados largamente na produção de rações para aquicultura e na indústria de alimentos.(SENGRUPTA *et al.*, 2012)

## 1.2. Amido da Batata (*Solanum tuberosum L.*)

O amido é um polissacarídeo de reserva da célula vegetal, formado por moléculas de glicose ligadas entre si através de numerosas ligações  $\alpha$  (1,4) e poucas ligações  $\alpha$  (1,6), ou "pontos de ramificação" da cadeia. É formado por dois tipos alfa-glucanos, amiloses (Fig.1-A) e amilopectina (Fig. 1-B), grande parte dos cereais mais comuns tem a estrutura do endosperma formada por percentagens de peso relativo entre 72 e 82% de amilopectina, e 18 e 33% de amilose (BULEÓN *et al.*, 1998).

Segundo Tester e John Karkalas. (2004), a amilose apresenta 99% de sua estrutura formada por ligações do tipo  $\alpha$ -1-4 e pode apresentar diversos tamanhos, dependendo de sua origem botânica, enquanto a amilopectina apresenta-se como uma molécula maior formada por 95% de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1-4) e 5% de ligações  $\alpha$  (1-6).

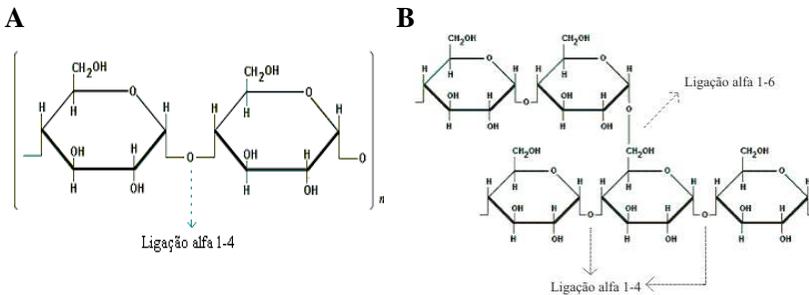


Figura 1 – Estrutura amilose (A) formada por ligações do tipo  $\alpha$ 1-4 entre as moléculas de glicose; estrutura amilopectina (B) formada por ligações do tipo  $\alpha$ 1-4 e  $\alpha$ 1-6 entre as moléculas de glicose (Adaptado por TESTER; JOHN KARKALAS, 2004).

O amido é estocado em forma de grânulos, sendo que amidos de cereais são pequenos, medem até 40  $\mu\text{m}$ ; os de tuberosas, como a batata, são maiores que 100  $\mu\text{m}$  e possuem um resistente envelope externo (BERGOT, 1993). Também apresentam organização cristalina e grânulos em formas elípticas, e apresentam resistência à hidrólise enzimática, pois em grânulos maiores, as taxas de hidrólise enzimática são menores, devido a menor área superficial específica (TATSUMI *et al.*, 2007).

Na batata 25% do amido é formado por amiloses e segundo Simkova *et al.* (2013), podem variar para alguns cultivares de 25,2% a 29,1%, com uma média de  $27,0 \pm 1,12\%$  (ALVANI *et al.*, 2011).

A batata (*Solanum tuberosum L.*) é uma das principais culturas para produção de amido sendo formada de 80 % de água e 20 % de matéria seca (FAO, 2008) e quando comparado com outras fontes amiláceas, como a mandioca e batata-doce, que possuem respectivamente cerca de 18-32% e 32% de amido em sua composição, na matéria úmida, o amido é o nutriente majoritário na matéria seca, com 60 a 80% (BERTOFT; BLENNOW, 2009).

Batatas (*Solanum tuberosum L.*) são cultivadas no mundo todo, sendo utilizadas principalmente como fonte de alimentação humana, seus tubérculos também são utilizados na fabricação de rações e sementes como propágulos, além disto, o amido fabricado a partir da batata tem uma vasta gama de utilizações finais. (KITA *et al.*, 2013).

Por esta razão, tem sido foco de estudo substancial por causa de seu uso como uma cultura alimentar e como uma fonte potencialmente significativa de compostos de interesse (MILLAM S., 2007).

### 1.3. Fisiologia do trato digestivo dos camarões

Nos camarões, a digestão química se inicia após o alimento atravessar no esôfago e chegar ao proventrículo do intestino anterior (Fig 1), após é encaminhado ao intestino médio (hepatopâncreas) e é misturado a secreções formadas principalmente por enzimas digestivas como proteases, lipases e carboidrases, resultando na digestão final e absorção dos nutrientes (LE MOULLAC *et al.* , 1997).

De acordo com Nunes *et al.* (2013) o hepatopâncreas é um órgão proeminente do intestino, devido ao seu volume e complexidade (ICELY; NOTT, 1992), e está localizado na região cefalotorácica e representando 2-6% do peso do corpo, em crustáceos ( CECCALDI, 1989).

Tem função importante na assimilação de nutrientes, assim como no fornecimento das reservas energéticas necessárias para o crescimento e metabolismo em crustáceos (DALL; MORIARTY, 1983).

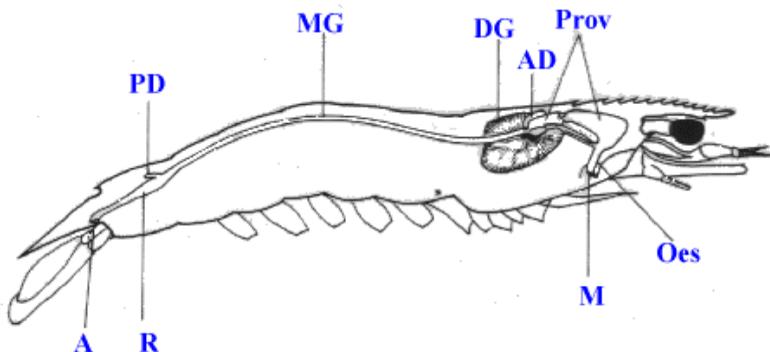


Figura 2 - Estrutura do sistema digestório de camarões; M (boca), Oes (esôfago), Prov (proventrículo), AD (intestino anterior), DG (glândula digestiva), MG (intestino médio), PD (Intestino Posterior), R (reto), A (ânus). Reproduzido por Dall *et al.* (1990).

Outro fator importante sobre a digestão em camarões é a evidência da membrana peritrófica em artrópodes.

Wang e Granados (2001) explicam que a MP é uma membrana não celular que reveste o intestino, servindo como barreira entre o lúmen do intestino e o epitélio do intestino médio, servindo também como proteção contra partículas abrasivas e agentes patogênicos de alimentos.

A MP é composta por associações de fibrilas de quitina com glicoproteínas e proteoglicanos (EINSEMAMM; BINNINGTON, 1994, TELLAM, 1999; HEGEDUS, 2009), e tem o propósito de auxiliar no processo de digestão, pois promove a digestão e imobilização de enzimas digestivas, permitindo a aquisição eficiente de nutrientes e reutilização de enzimas hidrolíticas.

De acordo com Terra (2011), a presença da membrana peritrófica resulta em uma melhoria na eficiência da fisiologia digestiva, pois causa um fator compensatório com diminuição da excreção das enzimas digestivas, facilitando a absorção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o efeito da concentração do amido de batata (*Solanum tuberosum* L.) sobre a atividade de  $\alpha$ -amilases nos segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) e hepatopâncreas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade e o gradiente de concentração de  $\alpha$ -amilases no hepatopâncreas e nas regiões anterior, média e posterior do intestino do camarão *L. vannamei*;
- avaliar o efeito da adição de níveis crescentes de amido de batata na dieta de *L.vannamei* sobre a atividade de  $\alpha$ -amilases presentes no seu trato digestivo;
- avaliar transcrição gênica de uma  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas e nos segmentos do intestino frente à adição de níveis crescentes de amido de batata na dieta de *L.vannamei*.

### 3. JUSTIFICATIVA

A dinâmica das enzimas digestivas no camarão branco *L. vannamei* não é completamente entendida e pesquisas a ela relacionadas podem contribuir para reduzir os custos envolvidos com a produção. Estudos sobre a digestão no camarão *L. vannamei* podem ser úteis para melhorar a formulação de rações, a fim de promover desempenhos mais positivos na carcinicultura.

Assim sendo, a quantidade e a qualidade de alguns componentes da dieta podem modificar ou modular a atividade das enzimas digestivas em peneídeos, como por exemplo, as amilases.

Contudo, a formulação de uma dieta balanceada e com nutrientes que contribuam na digestão, depende do conhecimento da bioquímica nutricional e, em nível molecular, da transcrição de genes que codificam enzimas digestivas bem como, da fisiologia desta espécie cultivada.

O artigo apresentado será submetido para a publicação na revista **Aquaculture Nutrition**.

## 4. ARTIGO CIENTÍFICO

**Caracterização da digestão do amido e transcrição gênica no camarão branco *Litopenaeus vannamei***

*Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis – SC*

*Endereço para correspondência – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, SC, CEP 88040-970, Brasil  
E-mail: migualdezi@hotmail.com*

**RESUMO**

O camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, representa uma das espécies mais cultivadas na aquicultura. Na produção de camarões, gastos com a alimentação representam 40 a 60% do custo. Contudo, o uso de fontes de energia alternativas, como os carboidratos, na elaboração de dietas, tem sido utilizadas.. O objetivo do trabalho foi caracterizar a digestão relativa e a transcrição gênica de uma  $\alpha$ -amilase nos segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) e hepatopâncreas do camarão branco *L. vannamei*. Camarões ( $12 \pm 0,5$  g n=6) foram submetidos a quatro tratamentos distintos, sendo alimentados com ração controle (CTRL), contendo 32% de proteína bruta, e dietas suplementadas com níveis crescentes de amido de batatas: 20%, 30% e 35%. Após sete dias de tratamento, os camarões foram dissecados e o hepatopâncreas (HPT), intestino, este dividido em três regiões, anterior (ANT), médio (MED) e posterior (POST), foram retirados. A atividade amilásica foi realizada pelo método de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), com quantificação protéica pelo método de Lowry. Além disso, a digestão do amido foi avaliada por meio de zimograma em SDS-PAGE 10%, copolimerizado com amido 2%, e corado com Lugol. A análise do nível transcricional da  $\alpha$ -amilase por q-PCR foi ainda realizada nos tecidos estudados. A atividade da amilase no HPT do camarão *L. vannamei* apresentou um aumento ( $p < 0,05$ ), quando submetido à dieta contendo 20% de amido. Os zimogramas referentes à atividade da amilase no HPT, ANT, MED e

POST apresentaram um perfil de bandas de massa molecular aparente entre 63 e 53 kDa, e entre 45 e 30 kDa. Resultados referentes à transcrição do gene de  $\alpha$ -amilase no HPT sugerem que níveis de atividade relativa da amilase podem ser correlacionados com níveis transcricionais.

Palavras-chave: amilase, camarão marinho, nutrição, digestibilidade, amido de batata, enzimas

## ABSTRACT

The white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is one of the most cultivated species in aquaculture. In shrimp production, expenditure on food represents 40-60 % of total costs. The objective of this study was to characterize the relative digestion and gene transcription profile of an  $\alpha$ -amylase in the intestinal segments (anterior, middle and posterior) and hepatopancreas of white shrimp *L.vannamei*. Shrimps ( $12 \pm 0.5$  gn = 6) were subjected to four different treatments and fed control diet (CTRL) diet containing 32% crude protein diets supplemented with increasing levels of starch potatoes: 20 %, 30 % and 35 %. After seven days of treatment, shrimp were dissected and the hepatopancreas (HPT) and intestine, the latter divided into three regions anterior (ANT), medium (MED) and posterior (POST), were removed. The amylase activity was measured by the method of 3,5-dinitrosalicilico acid (DNS), with protein quantification by the Lowry method. Furthermore, the starch digestion was assessed by SDS-PAGE zymogram 10% copolymerized with 2% starch, and stained with Lugol. Transcriptional levels of the  $\alpha$ -amylase gene by *q*-PCR were also performed. Amylase activity in HPT in *L. vannamei* showed an increase ( $p < 0.05$ ), when comparing to diet containing 20 % starch. The zymograms regarding amylase activity in HPT, ANT, MED and POST showed a profile similar to that observed in assays of enzyme activity. It was observed the predominant presence of bands of molecular weight in the range of 66-53 kDa, and 45-30 kDa. Results concerning the levels of  $\alpha$ -amylase gene transcription in HPT may suggest a correlation with levels of relative amylase activity

Keywords: amylase, marine shrimp, nutrition, digestibility, potato starch, enzymes

## 5. INTRODUÇÃO

A aquicultura na América do Sul tem crescido exponencialmente, principalmente devido à contribuição de países como o Peru e Brasil, havendo um domínio de 21,7% da produção mundial representada pelos crustáceos (FAO 2012).

Dentre os crustáceos, o camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, representa uma das espécies mais cultivadas (FAO 2012). Neste contexto, na produção de camarões, gastos com a alimentação representam 40 a 60% das despesas operacionais (Bender *et al.*, 2004).

Dado que, as proteínas são os componentes mais caros nas dietas de camarões e as proporções da sua inclusão nas formulações afetam o custo da ração para camarões marinhos (Martinez-Cordova *et al.* 2003) o uso de fontes alternativas de energia nas dietas como os carboidratos têm sido utilizadas (Cuzon *et al.* 2004; Amaya *et al.* 2007)).

A utilização de carboidratos em dietas para diferentes espécies de peixes e camarões cultivados tem provocado cada vez maior interesse de nutricionistas e produtores de alimentos (Niu *et al.* 2012). No entanto, a eficiência de assimilação de carboidratos depende da qualidade e quantidade do carboidrato inserido na dieta, assim como os mecanismos de regulação de atividade enzimática (Rosas *et al.* 2002).

Neste contexto, a exigência de proteínas para camarões, conforme Verri *et al.* (2001), pode ser menor que em outros decápodes, como a lagosta, pois as exigências de energia podem ser compensadas através dos carboidratos.

Porém, para a utilização de carboidratos na elaboração de dietas ainda se faz necessário mais estudos, visto que, em ambiente natural, estes animais aquáticos têm acesso limitado a fontes de carboidratos, podendo não ser adaptados à inclusão de níveis altos desse componente na dieta (Shiau *et al.* 2002).

Estudos envolvendo a utilização de fontes de carboidratos adicionados em diferentes níveis à dieta demonstraram que híbridos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) apresentaram melhor desempenho com a utilização de amido de milho acrescentado entre 22 e 46% (Wang *et al.* 2005). Outros estudos observaram o mesmo comportamento para carpa comum (Furuich & Yone 1982), tilápia do Nilo (Anderson *et al.* 1984), e bagre do canal (Wilson & Poe 1987).

Outro fator que pode esclarecer lacunas sobre a digestão dos carboidratos em peneídeos é o conhecimento a nível molecular, da

transcrição de genes que codificam enzimas digestivas, representando um importante instrumento para caracterização da eficiência na absorção e conversão dos alimentos, conforme a sua fisiologia.

Huvet *et al.*(2012) observaram em *Crassostrea gigas* o aumento dos níveis de mRNA dos genes de amilase(AMYA), enquanto (AMYB) sofreu diminuição da atividade, oferecendo um meio para a forma de adaptação a elevadas concentrações do substrato.

Adaptações em enzimas também foram observadas no camarão *Litopenaeus vannamei* sobre o incremento de fontes de caseínas e amido na dieta (Le Moullac *et al.* 1997).

Estes resultados podem indicar que a quantidade e a qualidade dos carboidratos na ração podem modular a atividade enzimática, bem como sua resposta quanto à transcrição de genes. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a digestão e a transcrição gênica de uma  $\alpha$ -amilase nos segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) e hepatopâncreas do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados camarões ( $n = 6$ ) da espécie *Litopenaeus vannamei* (média $\pm$ desvio padrão  $12\pm 0,5$  g) provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC). Os animais foram aclimatados por três dias e após este período separados em grupos de cinco animais e mantidos em caixas de polietileno (50 L) contendo 16 litros de água por caixa.

O experimento teve duração de setes dias. As caixas contavam com aeração constante e a temperatura foi mantida a 24 °C.

Os parâmetros físico-químicos da água como pH foi mantido em 7,5, Amônia Total (0,11mg/L) e salinidade ( $32 \text{ g L}^{-1}$ ) sendo mensurados uma vez/dia e salinidade e temperatura 2 vezes/dia, mantendo-se dentro dos níveis recomendáveis para o cultivo de camarões marinhos (Boyd & Massaut 1999, Teichert-Coddington *et al.* 1999).

O sifonamento foi realizado após cada alimentação com renovação de água de 10%. Os animais foram submetidos a quatro tratamentos distintos, sendo o grupo controle alimentado com ração balanceada com 32% de proteína bruta e as demais dietas foram suplementadas com níveis crescentes de amido de batata (Sigma®,

Steinheim, Alemanha): 20%, 30% e 35%. Os camarões eram alimentados três vezes/dia (2% da biomassa total do tanque).

## 6.1 Elaboração das dietas experimentais

Foi utilizada como base uma dieta comercial GUABI® contendo 32% de proteína bruta. Para garantir a precisão quanto aos valores nutricionais da ração basal a mesma foi encaminhada ao Laboratório de Nutrição (LABNUTRI/UFSC) onde foram realizadas análises da composição centesimal (Tabela 1). As suplementações de 20, 30 e 35% de amido de batata (Sigma®, Steinheim, Alemanha) sobre a ração basal foram elaboradas com a utilização do programa Optimal FORMULA 2000.

A formulação da ração foi realizada com base níveis de exigência nutricional da espécie *Litopenaeus vannamei* (NRC 2011) utilizando para o balanceamento das rações a inclusão de Albumina (como fonte de proteína) Óleo de soja (como fonte lipídica) com base nos valores nutricionais (TACO 2011).

As rações foram moídas em moedor (Moedor elétrico NR-10 BIV; Modelo PCP-22L, Brusque, Brasil) e posteriormente adicionados os valores calculados para 1,5 kg da ração basal. Após as mesmas foram homogeneizadas em batedeira industrial planetária tipo bp-20c, por 10 min. A mistura foi repeletizada, seca a 45 °C *overnight* e esfriada lentamente.

Tabela 1 Análise centesimal das rações suplementadas com amido

Amostra	Umidade*		Proteína Bruta*		Extrato Etéreo*		Cinzas*		Amido
	(% )		(% )		(% )		(% )		(%)
	MU <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	UM	MS	MU	MS	MU	MS	MS <sup>3</sup>
Dieta Controle	15,1	84,9	35,19	35,19	10,86	12,8	9,93	11,75	8,21
Dieta 20 % Amido	14,19	85,81	34,99	34,99	9,52	11,1	8,05	9,38	22,68
Dieta 30 % Amido	24,11	75,89	32,07	32,07	5,03	6,63	6,21	7,54	33,13
Dieta 35 % Amido	8,57	91,43	37,26	37,26	7,91	8,65	8,3	8,97	36,26

<sup>1</sup>Matéria Úmida: resultado apresentado com base na umidade natural do produto.

<sup>2</sup>Matéria Seca: resultado apresentado com base na matéria seca.

<sup>3</sup>Fator [=100 (microgramas de D-glucose)/Absorbância de 100 microgramas de D-glucose]

\*Segundo Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (1999).

## 6.2. Obtenção da Fonte Enzimática

Foram utilizados três camarões juvenis com um peso médio de  $12 \pm 0,5$  (média  $\pm$  desvio padrão) por tratamento. Os camarões foram imobilizados em gelo por 2 min, sendo os segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) e hepatopâncreas (Fig. 3) retirados, conforme descrito em trabalho realizado por Soonthornchai *et al.* (2010), respeitando sua estrutura digestiva, e submergidos em solução de NaCl 250 mM.

Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador tipo *potter* com auxílio de um pistilo e transferidos para tubos pré-identificados, seguido de centrifugação a  $10.000 \times g$  por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte enzimática nos ensaios. A quantificação proteica foi realizada pelo método de Lowry (1951).

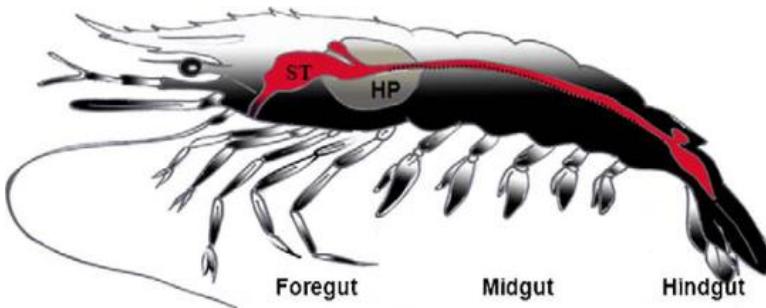


Figura 3 Demonstração do sistema digestório o qual é dividido em duas partes: ST (Intestino), hepatopâncreas (HP). O intestino é dividido em intestino anterior (foregut), médio (midgut) e o intestino posterior (hindgut). Reproduzido por Soonthornchai *et al.* (2010).

### 6.3. Ensaio atividade da $\alpha$ -amilase

A análise da atividade amilásica foi realizada através da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS). As amostras foram testadas em quatro tempos ( $\Delta t$ ) distintos, em intervalo de 60 min, com a adição de DNS ao final de cada tempo de incubação. Após, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e adicionado água ao final. As leituras foram realizadas em microplaca em uma absorbância a 550 nm no equipamento TECAN (Infinite pro., California, EUA)

### 6.4. Eletroforese em Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% tipo Zimograma com copolimerização de 2% amido

A digestão do amido foi avaliada através de zimograma em SDS-PAGE 10% copolimerizado com amido 2% conforme descrito por Martinez *et al.* (2000).

O gel tratado em solução de Triton X-100 2,5% e incubado em tampão citrato/fosfato pH 6,0 em estufa a 39 °C por 3 h, seguido de incubação com ácido tricloroacético por 10 min. A revelação da reação foi realizada com lugol 2%, conforme metodologia descrita por Campos *et al.* (1989).

### 6.5. Transcrição gênica da amilase em *qPCR*

#### 6.5.1. Desenho dos iniciadores para amilase

Os iniciadores para a amplificação dos genes de amilase foram desenhados com base nas sequências depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sendo utilizada a sequências (AMY SK 37, número de acesso EMBL X77318).

Os iniciadores foram desenhado com o auxílio dos programas Fast PCR (<http://primerdigital.com/fastpqr/>) e Primer Quest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), que avaliaram o conjunto de iniciadores que apresentavam semelhante temperatura de anelamento, proporção entre C e G em torno de 50% e tamanho do produto da amplificação por PCR entre 200 e 300 pb.

### 6.5.2. Extração de RNA total

A extração de RNA foi realizada em capela de exaustão, de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol® (Invitrogen).

A concentração e pureza do RNA foi checada em espectrofotômetro NanoDrop software ND1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) através da determinação das absorbâncias em 260 e 280 nm e do cálculo da razão entre elas para avaliar a integridade das amostras.

### 6.5.3. Síntese do cDNA

A transcrição reversa para síntese de cDNA a partir de 2µg de RNA total foi realizada utilizando o kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante, seguido de verificação de pureza conforme item anterior.

### 6.5.4. Padronização das condições de PCR em tempo real

O cDNA (100 ng) foi subsequentemente amplificado utilizando um conjunto de iniciadores, após testes, sendo específico para o gene de  $\alpha$ -amilase listado na Tabela 2.

Nas reações de *q*PCR foi utilizado o Quantifast™ SYBR Green (Qiagen), como um marcador de fluorescência, para detectar os produtos de PCR específicos.

Foram também selecionados sequências dos genes ribossomal 18S, com base numa sequência de *Fenneropenaeus merguensis* (GenBank número de acesso: DQ501247.1) e fator de alongamento-1 $\alpha$  com base numa sequência de *Fenneropenaeus merguensis* (número de acesso GenBank: AB458256), (Tabela 2), a fim de garantir que a expressão do gene não sofreria variações entre os tratamentos, definindo-o como normalizador para os tecidos avaliados.

Os genes de referência para os dados testados experimentalmente para  $\alpha$ -amilase foram ribossomal 18S, com base numa sequência de *Fenneropenaeus merguensis* (GenBank número de acesso: DQ501247.1) e fator de alongamento-1 $\alpha$ , com base numa sequência de *Fenneropenaeus merguensis* (número de acesso GenBank: AB458256)

Os parâmetros dos ciclos de *q*PCR para os genes de  $\alpha$ -amilase e o constitutivo ribossomal 18S, foram: desnaturação inicial de 95 °C durante 5 min, com início dos ciclos de desnaturação durante 10 s a

95 °C, seguido de anelamento por 30 s a 56 °C, tendo um número de 35 ciclos e para o gene alongamento-1 $\alpha$ : uma desnaturação de 95 °C por 5 min, desnaturação durante 5 min a 94 °C e anelamento de 50 °C por 30 s, com número de 35 ciclos.

Todas as curvas foram analisadas em duplicatas e através da curva de dissociação (*Melting*), foi possível confirmar a amplificação de um único produto.

Os dados foram coletados como Ct (*ciclo threshold*) usando o *software Gene* versão 6000 Rotor 1.7 (Corbett Research). O *threshold* foi definido mediante uma curva padrão, (*pool* das amostras diluídas de forma seriada: 400 ug, 200 ug, 100 ug e 50 ug), que apresentou a menor fluorência de amplificação de 100%, curva de linearidade ( $r^2$ ) superior a 98%. Os dados foram coletados usando o *software Rotor Gene* 6000 versão 1.7 (Corbett Reserch) que definindo o valor de Ct o número de ciclos no qual a fluorência para pelo *threshold*.

Tabela 2. Iniciadores para a *q*-PCR utilizados neste estudo

Descrição do Gene	Primer	Sequencia do Primer (5'-3')	Produto (bp)
Gene $\alpha$ -Amilase	Forward	GGTATCACCGCCTAACGAATAC	103
	Reverse	GGAGCGAGTGACGAGTTTATAG	103
Gene ribossomal 18S	Forward	CCGAATGGTCGTGCATGGAATGAT	127
	Reverse	GAATTTACCTCTAGCGTCGCAGT	127
Gene alongamento-1 $\alpha$	Forward	TGGAGACTGGTATCCTGAAG	122
	Reverse	GCATCTCCACAGACTTTACC	122

#### 6.5.5. Análise estatística

Os resultados enzimáticos foram avaliados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism*® versão 5.01, mediante Análise de Variância (ANOVA) para dados não paramétrico Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ ) seguido de teste de comparação múltipla de Dunn's.

O cálculo de transcrição dos genes e análise estatística foram realizados utilizando o *software REST* através dos dados de Ct de cada gene e os gráficos confeccionados pelo programa *GraphPad Prism*® versão 5.01. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi utilizada uma fonte de amido comercial devido ao seu grau de pureza resultar em uma melhor suplementação na dieta, podendo assim avaliar melhor o ingrediente. Também o processo de peletização utilizado pode ter promovido uma melhor assimilação e gelatinização do amido na ração, segundo Chamberlain (2004) a técnica de peletização pode promover até 50 a 60% de gelatinização do amido.

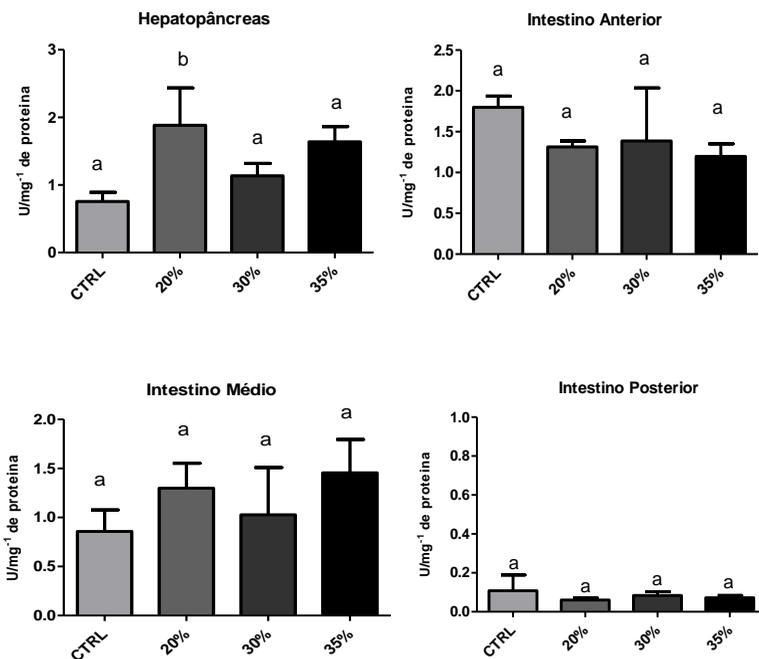


Figura 4 Atividade relativa de  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas nos segmentos do intestino anterior, médio e posterior de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas com amido (20, 30 e 35% de amido de batata na ração) e CTRL (grupo controle). Letras diferentes entre os níveis de suplementação representam diferenças significativas  $P < 0,05$ .

A atividade da  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* apresentou um aumento quando submetido à dieta contendo 20% de amido (Fig. 4), quando comparado com o grupo

controle ( $P < 0,05$ ). Os valores de atividade de amilase no segmento do intestino anterior, médio e posterior do *Litopenaeus vannamei* (Fig. 4) submetidos a dietas contendo 20, 30 e 35 % de amido, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com a dieta controle.

Neste contexto, Rosas *et al.* (2000) observaram uma curva de saturação da atividade  $\alpha$ -amilase na glândula digestiva de *Litopenaeus stylirostris*, que apresentou atividade máxima quando alimentado com dietas contendo 21 e 33% de carboidratos.

Estudos desenvolvidos sobre a utilização de carboidratos em dietas sobre o efeito nas amilases em peixes demonstraram um aumento da atividade da amilase em tambaqui (*Colossoma macropomum*) quando utilizado níveis de amido de milho de 40-50 % (Correa *et al.* 2007). Por outro lado, em pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) a atividade da amilase foi maior no estômago de peixes que receberam dietas contendo amido 13-25% (Lundstedt *et al.* 2004).

Vale salientar que o hepatopâncreas é uma glândula de síntese de enzimas (Le Moullac *et al.* 1997). Assim sendo, quando ofertado um maior nível de substrato, neste caso amido, a glândula irá produzir mais enzimas específicas para digerir este substrato, porém existe uma capacidade de limite. Desta forma, mesmo quando, a partir de uma determinada faixa de concentração limite mais substrato seja oferecido à enzima encontra-se saturada e os níveis de atividade permanecerão estabilizados (Eisenthal & Danson 2002). Tais informações podem explicar os resultados obtidos no presente estudo.

Alterações na atividade da enzima digestiva podem indicar respostas fisiológicas a diferentes condições nutricionais (Le Moullac *et al.* 1997) e tem-se a hipótese de que a atividade da enzima é elevada para os substratos que são mais comuns na dieta (Moss *et al.* 2001).

Por outro lado, o carboidrato pode ser adicionado à dieta em quantidade excessiva àquela eficientemente utilizada como energia (Krogdahl *et al.* 2005), o que pode resultar em maior deposição de gordura corporal, além de baixa utilização de outros nutrientes devido à diminuição do consumo da dieta (NRC 1993; HEMRE *et al.* 2002).

A capacidade de diferentes espécies em utilizar carboidratos depende da sua capacidade de oxidar a glicose a partir da digestão de carboidratos, e para armazenar o excesso de glicose como glicogênio ou gordura (Guo *et al.* 2006).

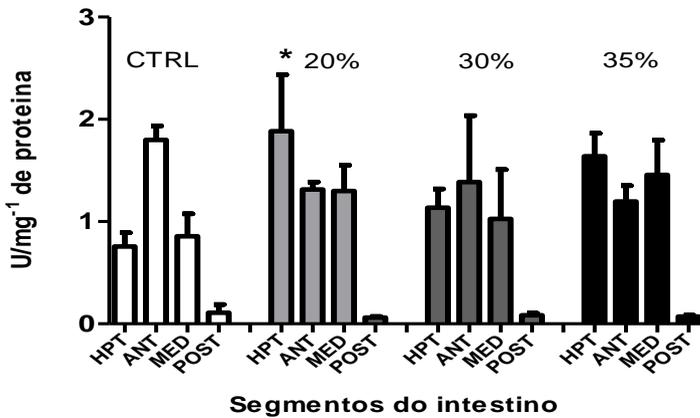


Figura 5 Perfil da atividade de  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas (HPT) e segmentos do intestino, anterior (ANT), médio (MED) e posterior (POST) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas (20, 30 e 35% de amido de batata na dieta) e CTRL (grupo controle).

\* Indica diferenças significativas entre tratamentos do mesmo segmento  $P < 0,05$ .

A atividade de  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas dos animais que receberam dieta contendo 20% de amido na dieta apresentou um aumento (Fig. 5), supostamente porque o incremento de substrato ativou uma maior demanda de enzimas digestivas da glândula digestiva, porém mantendo perfil nos segmentos intestinais. Já no perfil de 30% de amido na dieta, os valores obtidos no segmento anterior sugerem uma maior atividade enzimática (Fig. 5). A atividade da  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas e nos segmentos do intestino de camarões submetidos à dieta contendo 30% de amido apresentou maior semelhança com o perfil de atividade observado com a dieta controle (Fig. 5).

O intestino do camarão é formado por segmentos, e a digestão acontece nesses segmentos. O segundo segmento (intestino médio) possui uma membrana peritrófica a qual auxilia na ciclagem das enzimas e assim promove o aproveitamento das enzimas digestivas (Wang *et al.* 2012).

Corroborando com os resultados deste estudo onde a atividades da  $\alpha$ -amilase apresentaram um perfil decrescente nos segmentos do intestino demonstrando uma suposto carreamento destas

enzimas visto que sua atividade foi diminuída mesmo com o aumento do substrato na dieta.

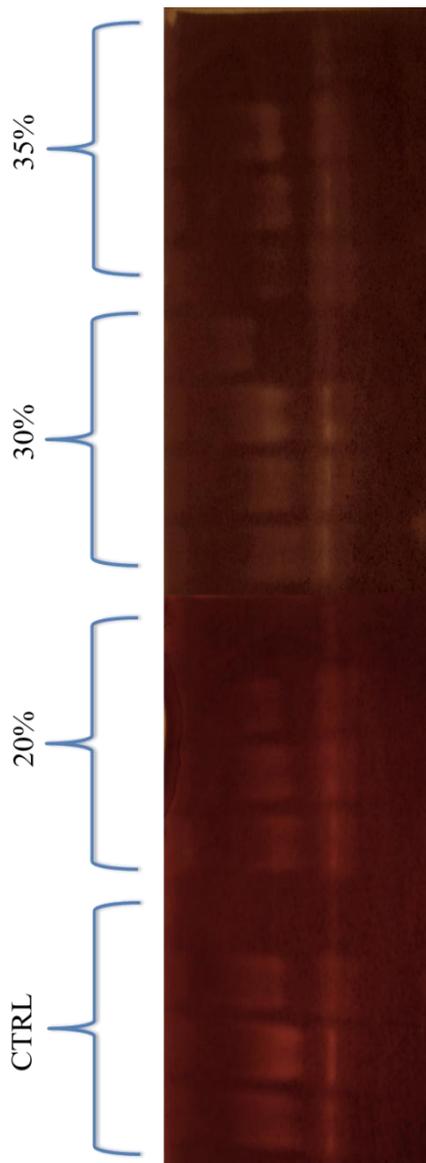


Figura 6 Géis de poliacrilamida SDS-PAGE (10 %) tipo zimograma copolimerizado com amido (2%), corado com Lugol. Demonstrando o perfil de atividade da amilase no *Litopenaeus vannamei* submetido a dietas suplementadas com amido de batata, onde CTRL representa tratamento referente à dieta Controle, 20% (dieta com 20% de amido), 30% (dieta com 30% amido) e 35% (dieta com 35%), no hepatopâncreas (H), intestino anterior (ANT), intestino médio (MED) e intestino posterior (POST).

A atividade da amilase nos segmentos do intestino e hepatopâncreas foram avaliadas também através de zimogramas, sendo esse, uma importante ferramenta para visualização da atividade de enzimas, bem como para identificar a possível ocorrência de isoformas da enzima estudada (Dojnov & Vujcic 2012).

Foi observado no zimograma (Fig. 6) referente a atividade da amilase no hepatopâncreas e segmentos do intestino (anterior, médio e posterior), um perfil de bandas semelhantes.

Há a presença de um número maior de bandas, quanto ao seu peso molecular, no hepatopâncreas e segmentos do intestino em anterior e médio exceto no segmento do intestino posterior (Fig. 6). Foram observadas bandas predominantes em todos os segmentos e tratamentos com massa molecular aparente entre 66 e 53 kDa e 45 e 30 kDa.

Vanwormhoudt *et al.* (1995) em estudo realizado com polimorfismo de  $\alpha$ -amilases em crustáceos encontrou pesos moleculares com cerca de 30 kDa para as duas isoenzimas da *Penaeus*, 35 kDa para a principal isoenzima do *Carcinus* tendo a menor ezoenzima um peso de 30 kDa e 55 kDa para *Procambarus* e *Eupagurus*.

Também no Zimograma (Fig. 6) foi possível observar a presença de bandas com menor intensidade no hepatopâncreas e nos segmentos do intestino, o que pode sugerir a presença de um número maior de isoformas.

Do mesmo modo, Castro *et al.* (2012) em estudo com amilases realizado com camarões de cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei* e espécies coletadas em ambiente natural (*Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus subtilis*) observa que o perfil das bandas obtidos em zimograma dos camarões de cultivo apresentam-se em maior número, supostamente devido ao maior número de isoformas, visto que, a dieta ofertada em cultivo contém maiores concentrações de carboidratos do que em ambiente natural, sugerindo assim que a presença de várias isoformas pode indicar que as espécies são capazes de aproveitar melhor o carboidrato da dieta.

O presente estudo também contou com análise da transcrição de um gene de  $\alpha$ -amilase, no hepatopâncreas e segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) dos camarões alimentados com dietas contendo 20, 30 e 35% de amido de batata na dieta.

Foi selecionado o gene ribossomal 18S como normalizador para todos os tecidos testados. A utilização de genes de manutenção

como controles internos baseia-se na premissa de que eles apresentam uma taxa de transcrição basal constante em todas as células eucarióticas e são independentes de influências fisiológicas (Thellin *et al.* 1999, Muhlia-Almazán *et al.* 2003).

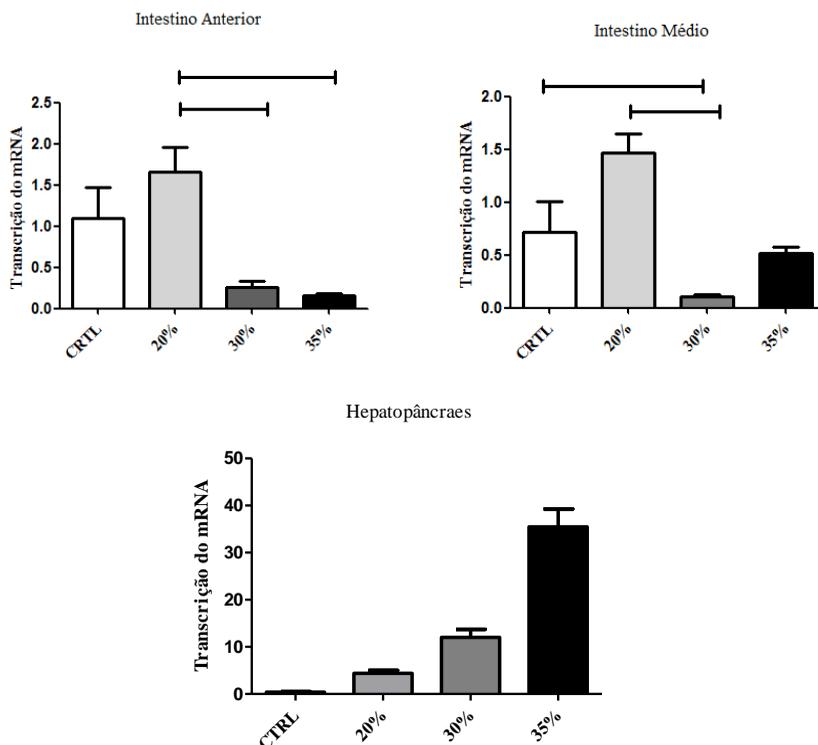


Figura 7 Transcrição relativa do gene da  $\alpha$ -amilase nos segmentos do intestino Anterior, Médio e Hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas com amido (20, 30 e 35% de amido de batata na ração) e CTRL (grupo controle). Barras sobrepostas representam diferenças estatísticas significativas  $P < 0,05$ .

No resultado referente à transcrição para o gene de  $\alpha$ -amilase nos segmentos do intestino anterior (Fig. 7) de camarões alimentados com dietas suplementadas com 20, 30 e 35% de amido de batata, os

níveis de transcrição do gene para  $\alpha$ -amilase para 20% de amido foram maiores quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), e para os níveis de 30% e 35% de apresentaram concentrações menores. Os níveis de transcrição no hepatopâncreas dos animais submetidos a dietas contendo 20%, 30% e 35% de amido de batata na dieta (Fig. 7) não apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), porém sugerem um aumento gradativo da concentração de transcritos para o gene de  $\alpha$ -amilase entre os tratamentos.

Klein *et al.* (1996) descreve para os genes de uma proteinase, tripsina, no intestino médio de *Litopenaeus vannamei* uma regulação a nível da transcrição, Muhlia-Almazán *et al.* (2003) também observaram aumento na transcrição relativa da tripsina, com o aumento dos níveis de proteína indicando um efeito positivo sobre a transcrição.

Para os níveis de transcrição no intestino médio (Fig. 6) a dieta contendo 20% de amido modulou a transcrição dos genes aumentando sua transcrição quando comparados ao grupo controle, também apresentando maior transcrição com as dietas com 30% e 35%.

Muhlia-Almazán & Garcia (2002) relataram que transcrição do gene de tripsina no intestino médio do camarão quando em estado de fome, não afetaram a correlação com a atividade da enzima.

Alguns estudos sugerem que determinada quantidade de mRNA não é traduzida em proteína, pois a eficiência da tradução em organismo eucarióticos pode variar consequentemente dependendo das características da sequência a ser transcrita (Kozak *et al* 1994, Dor & Kulka 1996).

Também vale salientar o fato de que mudanças observadas na concentração de transcritos pelo mRNA, podem não resultar em alterações fisiológicas observadas na concentração das enzima (Sánchez- Paz *et al.* 2001). Corroborando com os resultados do presente estudo onde a concentração de transcritos nos segmentos do intestino médio, apresentou diferença quando comparados com a transcrição neste segmento.

Não foram encontrados níveis de transcrição para  $\alpha$ -amilase no intestino posterior nas condições testadas em *q*-PCR.

A utilização de técnicas de biologia molecular, como análise em *q*-PCR na transcrição de genes vinculados a atividade de enzimas digestivas podem fornecer informações no desenvolvimento e na funcionalidade do sistema digestivo (Lazo 2011) e representa uma ferramenta promissora na nutrição de crustáceos.

Porém, a eficácia de tais ingredientes nas rações para carcinicultura e a capacidade de utilizar carboidratos na dieta quanto aos seus níveis ideais de inclusão dependem também da utilização de ferramentas que complementem os estudos como dados de conversão alimentar, digestibilidade do alimento, enzimas metabólicas endógenas a fim de garantir que um alimento pode ser benéfico para o organismo. (Omondi & Stark 1995).

Por fim, para o melhor esclarecimento dos resultados obtidos se fazem necessárias ainda análises de digestibilidade do amido de batata bem como, ensaios enzimáticos com outras enzimas digestivas com intuito de obter um melhor aproveitamento do ingrediente pelas enzimas refletindo assim sobre a nutrição do animal.

## 8. CONCLUSÕES

O perfil da atividade relativa da amilase no hepatopâncreas e segmentos do intestino (anterior, médio e posterior) foram desfeitos com a adição do amido de batata a partir de 30% de suplementação de amido de batata na dieta. O Zimograma pode contribuir na identificação de isoformas de amilase e sobre a visualização do perfil da atividade enzimática.

Os níveis de transcrição do gene de uma  $\alpha$ -amilase no hepatopâncreas podem sugerir correlação com os níveis de atividade relativa da amilase.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a eficácia dos ingredientes a serem utilizados nas rações na carcinicultura, independente de sua fonte, proteica ou energética, deve se levar em conta a capacidade do animal de utilizar os ingredientes a serem testados, quanto aos seus níveis ideais de inclusão, bem como, relacionar com outras ferramentas, que complementem os estudos como dados de conversão alimentar, digestibilidade do alimento, enzimas metabólicas endógenas entre outras, a fim de garantir que um alimento pode ser benéfico para o organismo.

O presente estudo teve como objetivo demonstrar como a atividade enzima digestiva específica para ingrediente testado (amido de batata) pode ser modulada mediante a suplementação de dietas, no sistema digestivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, no entanto, é se faz necessário relacionar os dados obtidos com outras análises a fim de determinar quais níveis de inclusão poderão ser realmente utilizados nas rações para camarões e não venham a comprometer o sucesso na produção.

## 10. AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de estudo, ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) pelo fornecimento dos animais ao Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI/ LAPAD) pelo auxílio com as análises e ao Laboratório de Bioquímica de Insetos pela contribuição na elaboração deste projeto.

## 11. REFERÊNCIAS

Amaya, E., Davis, D.A. & Rouse, D.B. (2007) Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **262**, 419-425.

Anderson, J., Jackson, A.J., Matty, A.J. & Capper, B.S. (1984) Effects of dietary carbohydrate and fibre on the tilapia *Oreochromis niloticus* (LINN.). *Aquaculture*, **37**, 303-314.

Bender, J., Lee, R., Sheppard, M., Brinkley, K., Phillips, P., Yeboah, Y. & Wah, R.C. (2004) Waste effluent treatment system based on microbial mats for black sea bass *Centropristis striata* recycled-water mariculture. *Aquacultural Engineering*, **31**, 73-82.

Boyd, C.E. & Massaut, L. (1999) Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, **20**, 113-132.

Campos, F.A.P., Xavier, J., Silva, C.P. & Ary, M.B. (1989) Resolution and Partial Characterization of Proteinases and Alpha-Amylases from Midguts of Larvae of the Bruchid Beetle *Callosobruchus-Maculatus* (F). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **92**, 51-57.

Castro, P.F., Freitas Jr, A.C.V., Santana, W.S., Costa, H.M.S., Carvalho Jr, L.B. & Bezerra, R.S. (2012) Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. *Journal of Crustacean Biology*, **32**, 607-613

Chamberlain, G. (2004). Re-emergence of extruded shrimp feed. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*, **1**, 18-20.

Correa, C.F., de Aguiar, L.H., Lundstedt, L.M. & Moraes, G. (2007) Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, **147**, 857-862.

Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C. & Guillaume, J. (2004) Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, **235**, 513-551.

Dojnov, B. & Vujcic, Z. (2012) Fast and reliable method for simultaneous zymographic detection of glucoamylase and  $\alpha$ -amylase in fungal fermentation. *Analytical Biochemistry*, **421**, 802-804.

Dor, Y., Raboy, B. & Kulka, R.G. (1996) Role of the conserved carboxy-terminal alpha-helix of Rad6p in ubiquitination and DNA repair. *Molecular Microbiology*, **21**, 1197-1206.

Erfanullah & Jafri, A.K. (1995) Protein-sparing effect of dietary carbohydrate in diets for fingerling *Labeo rohita*. *Aquaculture*, **136**, 331-339.

Eisenthal R. & Danson M.J. (2002). *Enzyme Assays: A Practical Approach.*, 2nd edn, pp. 1-282. Oxford University Press, New York, USA.

FAO (2010) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, p. 218.

FAO (2012) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, p. 209.

Furuichi, M. & Yone, Y. (1982) Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **48**, 945-948.

Guo, R., Liu, Y.-J., TIAN, L.-X. & HUANG, J.-W. (2006) Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and

microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture Nutrition*, **12**, 83–88.

Hemre, G.-I, Bjornevik, M., Beattie, C.; Björnson, B.T., Hansen, T. (2002) Growth and salt-water tolerance of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared under different combinations of dietary carbohydrate and photoperiod regime. *Aquaculture Nutrition*, **8**, 23-32.

Huvet, A., Jeffroy, F., Daniel, J.Y., Quere, C., Le Souchu, P., Van Wormhoudt, A., Boudry, P., Moal, J. & Samain, J.F. (2012) Starch supplementation modulates amylase enzymatic properties and amylase B mRNA level in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **163**, 96-100.

Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. & Van Wormhoudt, A. (1996) Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**, 551-563.

Kozak, U.C., Kopecky, J., Teisinger, J., Enerback, S., Boyer, B. & Kozak, L.P. (1994) An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 59-67.

Krogdahl, A., Hemre, G.I. & Mommsen, T.P. (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, **11**, 103-122.

Lazo, J.S. (2011) Molecular interventions (2001-2011): an experiment completed. *Mol Interv*, **11**, 62.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. & VanWormhoudt, A. (1997) Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **208**, 107-125.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.

Lundstedt, L.M., Melo, J.F. & Moraes, G. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **137**, 331-339.

NRC (1993) Nutrient requirement of fish and shellfish . In: Animal Nutrition Series (Hardy, R.W. ed), pp. 1-376. National Academy Press, Washington, DC, USA.

NRC (2011) Nutrient requirement of fish and shellfish . In: Animal Nutrition Series (Hardy, R.W. ed), pp. 1-392. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Martinez, T.F., Alarcon, F.J., Diaz-Lopez, M. & Moyano, F.J. (2000) Improved detection of amylase activity by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized starch. *Electrophoresis*, **21**, 2940-2943.

Martinez-Cordova, L.R., Torres, A.C. & Porchas-Cornejo, M.A. (2003) Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition*, **9**, 155-160.

Moss, S.M., Divakaran, S. & Kim, B.G. (2001) Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, **32**, 125–131.

Muhlia-Almazan, A. & Garcia-Carreno, F.L. (2002) Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **133**, 383-394.

Muhlia-Almazan, A., Garcia-Carreno, F.L., Sanchez-Paz, J.A., Yepiz-Plascencia, G. & Peregrino-Uriarte, A.B. (2003) Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **135**, 373-383.

Niu, J., Lin, H.Z., Jiang, S.G., Chen, X., Wu, K.C., Tian, L.X. & Liu, Y.J. (2012) Effect of seven carbohydrate sources on juvenile *Penaeus monodon* growth performance, nutrient utilization efficiency and hepatopancreas enzyme activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase and amylase. *Animal Feed Science and Technology*, **174**, 86-95.

Omondi, J.G., Stark, J.R. (1995). Some digestive carbohydrases from the midgut gland of *Penaeus indicus* and *Penaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Aquaculture*, **134**, 121-135.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C. & Van Wormhoudt, A. (2000) Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **249**, 181-198.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L. & van Wormhoudt, A. (2002) An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**, 47-67.

Sánchez-Paz, J.A. (2001) Regulacion adaptativa del mRNA de tripsina del hepatopancreas del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) bajo condiciones de stress alimenticio. *Master Thesis. Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., Mexico*, 62.

Shiau, S.Y., Lin, Y.H. (2002) Utilization of glucose and starch by the gopher *Epinephelus malabaricus* at 23 °C. *Fisheries Science*, **68**, 991-995.

Soonthornchai, W., Rungrassamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Soderhall, K. & Jiravanichpaisal, P. (2010) Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, **34**, 19-28.

TACO (2011) Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP, 4. ed. , pp.1-161. Book Editora, Campinas, SP, Brasil.

Teichert-Coddington, D.R., Rouse, D.B., Potts, A. & Boyd, C.E. (1999) Treatment of harvest discharge from intensive shrimp ponds by settling. *Aquacultural Engineering*, **19**, 147-161.

Terra, W.R. *et al.* (2011) Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (Lawrence, G.I.). pp.346-406. Amsterdam: Elsevier.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, **75**, 291-295.

Vanwormhoudt, A., Bourreau, G. & Lemoullac, G. (1995) Amylase Polymorphism in Crustacea Decapoda - Electrophoretic and Immunological Studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**, 139-149.

Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G.A. & Storelli, C. (2001) D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **130**, 585-606.

Wang, L., Li, F., Wang, B. & Xiang, J. (2012) Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, **33**, 1285-1291.

Wang, Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., Du, Z.Y., Wang, J.T., Wang, S. & Xiao, W.P. (2005) Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture Research*, **36**, 1408-1413.

Wilson, R.P. & Poe, W.E. (1987) Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. *Journal of Nutrition*, **117**, 280-285.

## 12. REFERENCIAS INTRODUÇÃO GERAL

ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Carcinicultura brasileira: estatísticas e revelações**. Disponível em <<http://abccam.com.br/site/category/s1-abcc/abcc-news/>> acesso em 11-dez-2013.

ALVANI, K. et al. Physico-chemical properties of potato starches. **Food Chemistry**, v.125, n.3, p. 958-965, abr. 2011.

ARNESEN, P.; KROGDAHL, A. Crude and Pre-Extruded Products of Wheat as Nutrient Sources in Extruded Diets for Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*) Grown in Sea-Water. **Aquaculture**, v. 118, n.1-2, p. 105-117, dez. 1993.

BERGOT, F. Digestibility of native starches of various botanical origins by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Nutrition in Practice**, v.61, n.1-2, p. 857-865, jun. 1993.

BERGOT, F. Problèmes particuliers posés par l'utilisation des glucides chez la truite arc-en-ciel. **Ann. Nutr. Alim.** v. 33, n.2, p. 247-257, 1979.

BERTOFT, Eric; BLENNOW, Andreas. Structure of Potato Starch, In: SINCH, Jaspreet. **Advances in Potato Chemistry and Technology**. New York, Lovdeep, 2009, p.83-94.

BULEÓN, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 23, n.2, p. 85-112, agos. 1998.

CECCALDI, H. J. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans decapods reared in aquaculture. **Adv Trop Aquacult**, v.9, p. 243-259, fev/mar. 1989.

COUSIN, M. et al. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origin. **Aquaculture**, v. 40, n.4, p. 361-372, abr. 1996.

CUZON, G. et al. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus* Proceedings. **WMS**, v. 11, n.1-4, p. 410-423, mar. 1980.

DALL, W.; MORIARTY, D.J.W. Functional aspects of nutrition and digestion: the midgut. In: BLISS, I; DOROTTY, E. **The Biology of Crustacean, Internal anatomy and physiological regulation**, v.5, Academic Press, Nova Iorque, 1983.p.215-251.

DALL, W. et al. The Biology of the Penaeidae. **Advances in Marine Biology**, v. 27, p. 1-461,1990.

EINSEMAMM, C.H.; BINNINGTON, K. C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. **Int J Parasitol**, v.24, n. 1, pp 15-26, fev. 1994.

EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese Informativa da Maricultura 2012**. Disponível em < <http://www.epagri.sc.gov.br/>> acesso em 11-01-2013.

FAO (2008) The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, p. 128.

FAO (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, p. 209.

FONSECA, S. B. et al. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p.1352-1358, out. 2009.

GUO, R. et al. Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n.1, p. 83-88, fev. 2006.

HEGEDUS, D. et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annu Rev Entomol.**, v.54, p. 285-302, set. 2009.

HERTRAMPF, J.W. Internal physical properties of shrimp feed. **Aqua Cult. Asia Pac.**, v. 3, n.2, p. 20-21, mar/abr. 2007.

ICELY, J.D; NOTT. J.A. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In: F.W. HARRISON, HUMES, A.G. **Microscopic anatomy of invertebrates**, New York (1992), Wiley-Liss, p. 147-201.

KITA, A. et al. The effect of frying on anthocyanin stability and antioxidant activity of crisps from red- and purple-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.32, n.2, 169-175, dez. 2013.

LE MOULLAC, G et al. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 208, n.1-2, 107-125, jan. 1997.

LIGHTNER, D.V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n.1, p. 110-130, jan. 2011.

MARTINEZ-CORDOVA, L.R.; CAMPAÑA TORRES, A.; PORCHAS-CORNEJO, M.A. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n.3, p.155-160, jun. 2003.

MELO, W. J.; BERTIPAGLIA, L. A.; MELO, G. P.; MELO, V. P. **Carboidratos**, Funep, Jaboticabal, SP, Brasil, 1998, p. 214.

MILLAM, S. Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Methods Mol Biol** , v. 334, p.25-35, 2007.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Espécies cultivadas. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>> acesso em 08-11-2011.

NIETO-LÓPEZ, M et al. Digestibility of different wheat products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, v. 319, n. 3-4, p. 369–376, out. 2011.

NIU, J. et al. Effect of seven carbohydrate sources on juvenile *Penaeus monodon* growth performance, nutrient utilization efficiency and hepatopancreas enzyme activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase and amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v.174, n.1-2, p.86-95, jun. 2012.

NUNES, E.T.; BRAGA, A.A.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. **Acta Histochem**, v. 29, In Press, out. 2013.

PERES, H.; GONÇALVES, A. A.; OLIVA-TELES, A. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 179, n.1-4, p.415–423, set. 1999.

ROSAS, C. et al. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, n.1, p. 47-67, fev. 2002.

ROSAS, C. et al. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 249, n.2, p.181-198, jun. 2000.

SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Influence of non-starch polysaccharides isolated from wheat flour on the gelatinization and gelation of wheat starches. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n.4, p. 295-303, jul. 2000.

SÁNCHEZ-PAZ, A. et al. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 340, n.2, p. 184-193, jan.2007.

SENGRUPTA, I.; ROY, M.P.; PATRA, A. Study on gut-associated amylase-producing bacteria in some commercially important freshwater riverine ichthyofauna of north Bengal (West Bengal, India). **J. Zool.** v. 1, n.1, p.1-7, mai/agos. 2012.

SHIAU, S.Y.; LIN, S.F.; LU, L.J. Effects of different types of wheat flour in feeds for grass prawn *Penaeus monodon*. **Nippon Suisan Gakk.** v. 57, n.4, p. 705–710, 1991.

SHIAU, S.Y. Nutrient requirement of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.164, n.1-4, p.77-93, mai. 1998.

SHIMKOVA, D. et al. Effect of cultivar, location and year on total starch, amylose, phosphorus content and starch grain size of high starch potato cultivars for food and industrial processing. **Food Chem.**, v. 141, n.4, p. 3872-3880, dez. 2013.

SIMON, C. J.; JEFFS, A.G. The effect of dietary carbohydrate on the appetite revival and glucose metabolism of juveniles of the spiny lobster, *Jasus edwardsii*. **Aquaculture**, v. 384-387, p.111-118, 2013.

SPANNHOF, L.; PLANTIKOW, H. Studies on Carbohydrate Digestion in Rainbow-Trout. **Aquaculture**, v. 30, n. 1-4, p. 95-108, jan. 1983.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanusbidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. **Aquaculture Research**, v. 34, n.2, p. 123-134, jan. 2003

TATSUMI, H.; KATANO, H.; IKEDA, T. Kinetics analysis of glucoamylase-catalyzed hydrolysis of starch granules from various botanical sources. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 71, n.4, p. 946-950, abr. 2007.

TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem Mol Biol.**, v.29, n.2, p. 87-101, fev. 1999.

TERRA, W.R. et al. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, In: LAWRENCE, G.I. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2011, p.346-406.

TESTER, R. F; JOHN KARKALAS, X. Q. Starch – composition, fine structure and architectura. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n.2, p.151-165, mar. 2004.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, n.2, p.110-118, jun. 2001.

WIGGLESWORTH, J.M.; GRIFFITH, D.R.W. Carbohydrate Digestion in *Penaeus-Monodon*. **Marine Biology**, v.120, n.4, p.571-578, 1994.